

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

This invention relates to a cellular adhesiveness peptide content base material. It is related with the cellular adhesiveness peptide content base material optimal as a base material for implant in more detail.

[0002]

[Description of the Prior Art]

as a former and cellular adhesiveness peptide content base material — collagen of natural origin, and living body embedding — public funds — the cellular adhesiveness peptide content base material which consists of group titanium is known (JP,H8-332217,A).

[0003]

[Problem to be solved by the invention]

There is a problem that the danger that infection substances, such as prion and a virus of the Homo sapiens infectiosity, contain is in protein since the protein of natural origin is used for the conventional cellular adhesiveness peptide content base material. There is also a problem that cellular adhesiveness is still lower. That is, the purpose of this invention is not to use the protein of natural origin but to provide the high cellular adhesiveness peptide content base material of cellular adhesiveness.

[0004]

[Means for solving problem]

As a result of coming research in piles wholeheartedly, by using specific peptide, this invention person found out attaining the above-mentioned purpose, and reached this invention. That is, the feature of the cellular adhesiveness peptide content base material of this invention has the content of endotoxin in the point which consists of cellular adhesiveness artificial peptide which is less than 0.15 EU/mg, and an implant material based on the weight of cellular adhesiveness peptide.

[0005]

[Mode for carrying out the invention]

Cellular adhesiveness artificial peptide contains minimum amino acid sequence (X) showing a cell adhesion signal. Specific minimum amino acid sequence (X) is recognized by the integrin receptor of a cell, and "cellular adhesiveness" means the character a cell becomes easy to paste up on a base material (a Ritsu OSAKA Prefecture mother-and-child medical center magazine, volume [ 8th ] No. 1, 58-66 pages, 1992). As minimum amino acid sequence (X) showing a cell adhesion signal, what is indicated in "pathophysiology, volume [ 9th ] No. 7, 527-535 pages, 1990", and "a Ritsu OSAKA Prefecture mother-and-child medical center magazine, volume [ 8th ] No. 1, 58-66 pages and 1992" is used, for example.

[0006]

In these minimum amino acid sequence (X)s, Arg Gly Asp arrangement, Leu AspVal arrangement,

Arg Glu Asp Val arrangement (1), Tyr Ile Gly Ser Arg arrangement (2), Pro Asp Ser Gly Arg arrangement (3), Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg arrangement (4), Leu Gly Thr Ile Pro Gly arrangement (5), Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile arrangement (6), Ile Lys Val AlaVal arrangement (7), Leu Arg Glu arrangement, Asp Gly Glu Ala arrangement (8), Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro arrangement (9), Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys arrangement (10), HisAla Val arrangement, and Tyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser arrangement (11) are preferred. From a viewpoint of cellular adhesiveness, it is Arg Gly Asp arrangement, Tyr Ile Gly Ser Arg arrangement (2), and Ile Lys Val Ala Val arrangement (7) still more preferably, and is Arg Gly Asp arrangement especially preferably. An amino acid sequence is expressed with trigraph sequence, and the array number corresponding to an amino acid sequence table is indicated in ( ) (it is the same hereafter.).

[0007]

Although cellular adhesiveness artificial peptide should just have said minimum amino acid sequence (X) in [ at least one ] one molecule, what it has in [ 2-50 ] one molecule has it in [ 5-20 ] one molecule preferably especially in [ 3-30 ] one molecule desirable still more preferably from a viewpoint of cellular adhesiveness. Two or more sorts of arrangement may be included in a monad.

[0008]

3,000,000 or less are 300,000 or less especially preferably 1,000,000 or less desirable still more preferably, and 300 or more are desirable still more preferred, and the number average molecular weight of cellular adhesiveness artificial peptide is 3,000 or more especially preferably 1,000 or more. The number average molecular weight of cellular adhesiveness artificial peptide is the SDS-PAGE (SDS polyacrylamide gel electrophoresis) method, separates cellular adhesiveness artificial peptide, and asks for it by comparing migration distance with a standard substance (it is the same hereafter.).

[0009]

The peptide which consists of Arg Gly Asp Ser arrangement (14) as cellular adhesiveness artificial peptide, for example, The peptide which consists of Gly Arg Gly Asp Ser arrangement (15), The peptide which consists of Gly ArgGly Asp Ser Pro arrangement (16), The peptide which consists of Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro arrangement (17), The peptide which consists of Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala (18), The peptide which consists of Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser (19), The peptide which consists of Cys Ser Arg Ala ArgLys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg (20), The polymer etc. which consist of at least peptide which consists of Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp (21), and these peptide of a kind of can be illustrated. As a polymer, for example,  $_4$  (Arg Gly Asp Ser) arrangement (22),  $(\text{Arg Gly Asp Ser})_8$  arrangement (23),  $_{16}$  (Arg Gly Asp Ser) arrangement (24),  $(\text{Gly Arg Gly Asp Ser})_8$  (25),  $_8$  (Gly Arg Gly Asp Ser Pro) (26),  $(\text{Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro})_4$  (27),  $(\text{Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala})_4$  (28),  $(\text{Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser})_4$  (29),  $(\text{Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg})_4$  (30), Or  $(\text{Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp})$  the peptide etc. which consist of  $_4$  (31) are mentioned. the degree of polymerization of this polymer — 2-50 — desirable

— further — desirable — 3-30 — especially — desirable — 4-20 — it is 4-16 most preferably.

[0010]

minimum amino acid sequence (X) to which an amino acid sequence of cellular adhesiveness artificial peptide expresses a cell adhesion signal — as an amino acid sequence (Y) of an except, Gly Ala Gly Ala Gly Ser arrangement (12), Gly Val Gly Val Pro arrangement (13), Gly Pro Pro arrangement and Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly ProGly Arrangement (32), Gly Ala Pro Gly Ala. Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln arrangement (33) and/or Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro arrangement (34). Furthermore it has, and since it becomes easy to cover increase and cellular adhesiveness artificial [ stability ] peptide and a cellular adhesiveness peptide content base material to heat over heat sterilization, such as autoclave, things are preferred. Gly Ala Gly Ala Gly Ser arrangement (12) among these amino acid sequences (Y), Gly ValGlyVal Pro arrangement (13) and Gly Pro Pro arrangement are Gly Ala Gly Ala Gly Ser arrangement (12) desirable still more preferably. Case, cellular adhesiveness artificial peptide has an amino acid sequence (Y), and content of an amino acid sequence (Y). What it has in [ 3-10,000 ] one molecule of cellular adhesiveness artificial peptide from a viewpoint of stability over heat has in [ 30-1,000 ] one molecule preferably especially in [ 10-3,000 ] one molecule desirable still more preferably.

[0011]

The ratio [(X)/(Y)] of amino acid sequence (X) in cellular adhesiveness artificial peptide, and the number with an amino acid sequence (Y), 0.002 or more are 0.05 or more especially preferably 0.01 or more desirable still more preferably, and ten or less are 0.5 or less especially preferably two or less desirable still more preferably. It is preferred that amino acid sequence (X) and an amino acid sequence (Y) are located by turns from a viewpoint in which cellular adhesiveness artificial peptide tends to take beta turn structure.

[0012]

As cellular adhesiveness artificial peptide which has an amino acid sequence (Y), For example, number average molecular weight about 100,000 peptide which has <sub>9</sub> (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (35) and about 12 Arg Gly Asp arrangement at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Number average molecular weight about 100,000 peptide which has <sub>9</sub> arrangement (35) and about 13 Tyr Ile Gly Ser Arg arrangement (2) at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Peptide of number average molecular weight about 100,000 \*\* which have <sub>9</sub> arrangement (35) and about 12 Ile Lys Val Ala Val arrangement (7) at a time, respectively, (Gly Val Gly Val Pro) Number average molecular weight about 100,000 peptide which has <sub>9</sub> arrangement (36), and about 12 12 (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (37) and Arg Gly Asp arrangement at a time, respectively, It reaches (Gly Ala Pro Gly Pro.). Number average molecular weight about 50,000 peptide etc. which have Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro<sub>2</sub> (38) arrangement and about six Arg Gly Asp arrangement at a time, respectively. (For example) JP,H3-502935,A and handbook . OBU poly Mars Bio-DEGURA double (Handbook of Biodegradable the Abraham work, Harewood academic pub RISSHAZU issue, Amsterdam 1997,Abraham J. Domb work, and) Polymers, Harwood Academic Publishers issue, Amsterdam 1997, etc. are mentioned.

[0013]

As cellular adhesiveness artificial peptide which can be obtained from a commercial scene, The peptide which will consist of RGDS[Arg Gly Asp Ser arrangement (14) if a trade name is indicated, The number average molecular weight 400 [ about ], Peptide Institute], the peptide that consists of GRGDS[Gly Arg Gly Asp Ser arrangement (15), The number average molecular weight 500 [ about ], Peptide Institute], Peptide, the number average molecular weight 60,000 [ about ] which have CS1 signal, the cell adhesion domain TypeIII, and every one heparin bonding domain II which are RetroNectin(recombinant Homo sapiens fibronectin CH-296) [Homo sapiens fibronectin cell adhesion signals, ""] by TAKARA SHUZO CO., LTD., and RGDS-Protein A The peptide which inserted Arg Gly Asp arrangement in Protein A (IgG connection domain), It has respectively the number average molecular weight 30,000 [ about ], by TAKARA SHUZO CO., LTD., PURONE cutin F[Arg Gly Asp arrangement, and about 12 , (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (35), Peptide, the number average molecular weight 100,000 [ about ], by Sanyo Chemical Industries, Ltd. which are manufactured with transgenics Escherichia coli, What the PURONE cutin F plus [PURONE cutin F was made to react to JIMERU aminoethyl chloride, and was made into water solubility, It has respectively] by Sanyo Chemical Industries, Ltd. and PURONE cutin L[Ile Lys Val Ala Val arrangement (7), and about 12 , (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (35), Peptide, the number average molecular weight 100,000 [ about ], by Sanyo Chemical Industries, Ltd., etc. which are manufactured with transgenics Escherichia coli are mentioned.

[0014]

Cellular adhesiveness artificial peptide is manufactured artificially and can be easily manufactured by organic synthesis methods (enzymatic process, a solid-phase-synthesis method, liquid phase synthesis method, etc.) and gene recombination. That is, cellular adhesiveness artificial peptide does not contain what embellished some natural cellular adhesiveness peptide with poly-L-lysine etc., excluding natural cellular adhesiveness peptide, such as collagen and fibronectin. It is related with an organic synthesis method and they are the biochemistry experiment lecture 1 and the proteinic chemistry IV (on July 1, 1981.), for example. Edited by Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dojin Issue or New Biochemistry Experiment Lectures 2, the method indicated for proteinic chemistry (below) (Showa 62(1987) May 20, edited by Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dojin Issue), etc. are applicable. About gene recombination, the method etc. which are indicated to JP,H3-502935,A are applicable, for example. Since an impurity recombination from microorganism may be included when based on gene recombination, It is 95 weight % or more for affinity refining using an anti peptide antibody etc., etc. to refine, and to carry out purity of peptide to 80weight % or more especially preferably 90weight % or more desirable still more preferably. The viewpoint that the amino acid sequence of cellular adhesiveness artificial peptide can be designed and manufactured easily to gene recombination is [ among these ] preferred.

[0015]

As cellular adhesiveness artificial peptide by an organic synthesis method, For example, Arg Gly AspSer arrangement (14), Gly Arg Gly Asp Ser arrangement (15), The peptide etc. which have at least one sort of amino acid sequences chosen from the group which consists of Gly Arg Gly Asp Ser Pro arrangement (16) and Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro arrangement (17) are mentioned.

[0016]

As cellular adhesiveness artificial peptide by gene recombination, For example, number average molecular weight about 100,000 peptide which has <sub>9</sub> (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (35) and about 12 Arg Gly Asp arrangement at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) Number average molecular weight about 100,000 peptide which has <sub>9</sub> arrangement (35) and about 13 Tyr Ile Gly Ser Arg arrangement (2) at a time, respectively, (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) The number average molecular weight about 100,000 \*\* peptide which has <sub>9</sub> arrangement (35) and about 12 Ile Lys Val Ala Val arrangement (7) at a time, respectively, (Gly Val Gly Val Pro) Number average molecular weight about 100,000 peptide which has <sub>9</sub> arrangement (36), and about 12 12 (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (37) and Arg Gly Asp arrangement at a time, respectively, And (Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro) number average molecular weight about 50,000 peptide etc. which have <sub>2</sub> (38) arrangement and about six Arg Gly Asp arrangement at a time, respectively are mentioned.

[0017]

Based on the weight of cellular adhesiveness peptide, less than [ the viewpoint of safety to ] 0.15 are desirable still more preferred, and the content (EU/mg) of the endotoxin in cellular adhesiveness peptide is less than 0.0015 especially preferably less than 0.015. The Limulus test method using the corpuscle extract of a king crab reacting to endotoxin, and congealing as a measuring method of endotoxin content, etc. are applicable. If a trade name shows as a reagent kit for Limulus tests which can be easily obtained from a commercial scene, Lim Luce F single Test Wako (made by WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES LTD.), Lim Luce ES-2 single Test Wako (made by WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES LTD.), etc. will be mentioned, for example. Preparation of the sample liquid used for a reagent kit is performed by dissolving cellular adhesiveness peptide in endotoxinic test service water or the method water for injection of an office. As a standard substance, the endotoxin reference standard defined in the Pharmacopoeia of Japan and the standard substance authorized with this endotoxin reference standard can be used.

[0018]

As a measuring method of endotoxin content using a commercial Limulus test reagent kit, For example, sample liquid 0.200mL which dissolved a 1.00-mg test portion (cellular adhesiveness peptide) in 1.00mL of endotoxinic test service water (distilled water etc.), It supplies to one of a LAL reagent (the freeze-dried corpuscle extract of an American king crab (*Limulus polyphemus*)), and mixes, and the visual judgment of whether the gel of water-insoluble nature is formed after 1-hour standing at 37 \*\* is carried out. If gel is formed, it can judge with endotoxin content being 0.015 or more EU/mg, and if gel is not formed, it can judge with endotoxin content being less than 0.015 EU/mg. If it changes to a 1.00-mg test portion and a 0.100-mg test portion is used, the judgment of 0.15 or more EU/mg and the following can do content similarly. The judgment of 0.0015 or more EU/mg and the following can be performed by using a 10.0-mg test portion similarly. When gel formation is delicate, it can judge by a visual judgment, a turbidimetry, or volume measurement of gel non-formed parts by considering as contrast the endotoxin reference standard defined in the Pharmacopoeia of Japan, or the standard substance authorized with the

endotoxin reference standard. That is, in less than 0.15, when the endotoxin test service-water solution (concentration: 1 mg/mL) and LAL reagent (book) of cellular adhesiveness artificial peptide are mixed with mixture ratio 0.200mL/a book, it means not producing gel.

[0019]

As a method of measuring endotoxin content of cellular adhesiveness artificial peptide combined with an implant material, Although not limited in particular, when cellular adhesiveness artificial peptide is carrying out the chemical bond to an implant material, for example, Cellular adhesiveness artificial peptide which feeds an implant material into enzyme solutions, such as protease, and dissociates, By affinity chromatography etc., remove and refine an enzyme and it freeze-dries. (For example, temperature up is carried out to 25 °C over 12 hours under decompression of 0.05 Pa after freezing at -30 °C, and reduced pressure drying is carried out at 25 °C more for 12 hours.) By carrying out, a powder article of cellular adhesiveness artificial peptide can be obtained, and it can measure in accordance with a measuring method of the above-mentioned endotoxin content. When cellular adhesiveness artificial peptide is carrying out physical adsorption to an implant material, Cellular adhesiveness artificial peptide which feeds an implant material into solutions, such as lithium perchlorate, and dissociates, By dialysis using permeable membrane, etc., remove and refine lithium perchlorate and it freeze-dries. (For example, temperature up is carried out to 25 °C over 12 hours under decompression of 0.05 Pa after freezing at -30 °C, and reduced pressure drying is carried out at 25 °C more for 12 hours.) By carrying out, a powder article of cellular adhesiveness artificial peptide can be obtained, and it can measure in accordance with a measuring method of the above-mentioned endotoxin content.

[0020]

Since endotoxin is contained in the cell wall of gram negative bacteria, endotoxin may be mixed in cellular adhesiveness peptide, when cellular adhesiveness peptide was manufactured by the gene recombination by gram negative bacteria, or when cellular adhesiveness peptide is dealt with except a non-fairy ring boundary. In such a case, as a method of removing the endotoxin mixed in cellular adhesiveness peptide, For example, the combination etc. of the heating methods which deactivate endotoxin with heat using a column method, autoclave, or a hot air sterilizer etc. which separates endotoxin using a gel filtration column or the column for hydrophobic chromatography, and these methods are applicable. It is a heating method with simple sterilization operation and removal of endotoxin positive [ among these ]. As cooking temperature, not less than 60 °C not less than 40 °C is not less than 80 °C especially preferably desirable still more preferably, and 180 °C or less 160 °C or less is 140 °C or less especially preferably desirable still more preferably. 1 seconds or more are 1 minutes or more especially preferably 10 seconds or more desirable still more preferably, and 5000 or less minutes is desirable still more preferred, and cooking time is 100 or less minutes especially preferably 500 or less minutes.

[0021]

As an implant material, a ceramics material, a metallic material, the charge of an organic high polymer material, the composite material that has these two or more sorts, etc. can be used, for example.

As a ceramics material, for example Hydroxyapatite, calcium phosphate (tricalcium phosphate

[beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) etc.] etc. (TCP)], Bio-glass ( $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ ) [SERABI tar ( $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O-MgO}$ ) etc.], CPSA [ $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ ] glass fibre composite, Apatite wollastonite (A-W) crystallized glass [ $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-P}_2\text{O}_5$ ], Alumina, zirconia, carbon, a titania, sapphire, silicon carbide, silicon nitride, these composite materials (the foundation 14 of transplantation, an artificial organ, and Iwanami lecture contemporary medicine, Iwanami Shoten Issue, JP,H7-88174,A, etc.) it has two or more sorts, etc. are mentioned. Hydroxyapatite, TCP, beta-TCP, bio-glass, SERABI tar, CPSA glass fibre composite, A-W crystallized glass, alumina, and zirconia are hydroxyapatites desirable still more preferably among these.

[0022]

As a metallic material, for example Titanium, aluminum, cobalt, chromium, The composite material etc. which have molybdenum, iron, nickel, a zirconium, niobium, tantalum, and two or more sorts of these are mentioned (the foundation 14 of transplantation, an artificial organ, and Iwanami lecture contemporary medicine, Iwanami Shoten Issue, JP,H7-88174,A, etc.). As a composite material, titanium alloys (Ti-6aluminum-4V, Ti-6aluminum-2Nb-1Ta, etc.), a cobalt-chromium alloy, etc. are mentioned. Titanium and a titanium alloy are [ among these ] preferred.

[0023]

As a charge of an organic high polymer material, for example Polymethylmethacrylate, polystyrene, Polyvinyl alcohol, polypropylene, polyethylene, the composite material that has two or more sorts of these, etc. are mentioned (the foundation 14 of transplantation, an artificial organ, and Iwanami lecture contemporary medicine, Iwanami Shoten Issue, JP,H7-88174,A, etc.). Polymethylmethacrylate and polyethylene are [ among these ] preferred. The weight average molecular weight (gel permeation chromatography method) of the charge of an organic high polymer material, Still more preferably, 50 million or less, it is especially desirable, 10 million or less and 05000 or more are desirable still more preferred, and 250 million or less are 100,000 or more especially preferably 20,000 or more preferably.

[0024]

As a composite material which has these two or more sorts, for example, a composite material (for example, a composite material of hydroxyapatite and titanium.) of a charge of a ceramic material, and a metallic material A composite material of beta-TCP and titanium, a composite material of A-W crystallized glass and titanium, etc., a composite material (for example, a composite material of titanium and polymethylmethacrylate.) of a metallic material and a charge of an organic high polymer material And a composite material of a charge of a ceramic material and metallic materials, such as a composite material of titanium and polyethylene, and a charge of an organic high polymer material. (For example, composite material of hydroxyapatite, titanium, and polyethylene, etc.) etc. — it is mentioned (the foundation 14 of transplantation, an artificial organ, and Iwanami lecture contemporary medicine, Iwanami Shoten Issue, JP,H7-88174,A, etc.).

[0025]

A composite material of a ceramics material, a metallic material and a ceramics material, and a metallic material is [ among these ] preferred, further — desirable — a composite material of a metallic material and a ceramics material, and a metallic material — they are a composite material

of titanium, and hydroxyapatite and titanium, a composite material of beta-TCP and titanium, and a composite material of A-W crystallized glass and titanium especially preferably. As a form of a composite material which has these two or more sorts, What coated a metallic material with a charge of a ceramic material, a thing which equipped a metallic material with a charge of an organic high polymer material with a screw etc., What equipped with a charge of an organic high polymer material with a screw etc. what coated a metallic material with a charge of a ceramic material is mentioned (the foundation 14 of transplantation, an artificial organ, and Iwanami lecture contemporary medicine, Iwanami Shoten Issue, JP,H7-88174,A, etc.).

[0026]

Especially as form of an implant material, there is no restriction, for example, the form of a description is mentioned to the form of an artificial hip joint, the form of an artificial knee joint, the form of a dental implant, the form "transplantation, artificial organ (foundation 14 of the Iwanami lecture contemporary medicine), and Iwanami Shoten Issue" of bone assistant and material, etc.

[0027]

The cellular adhesiveness peptide content base material of this invention can be manufactured by a publicly known method, for example, can manufacture cellular adhesiveness peptide physical adsorption, by carrying out a chemical bond, etc. to an implant material. As a method of carrying out physical adsorption to an implant material, cellular adhesiveness peptide, For example, the method of contacting the solution or dispersion liquid which made solvents (for example, water, ethanol, dimethyl sulfoxide, or lithium perchlorate solution etc.) etc. dissolving or distributing cellular adhesiveness peptide to an implant material (a coating, impregnation, or mixing) etc. are applicable. Then, it can be made to stick to an implant material by flushing the solution or dispersion liquid of cellular adhesiveness peptide with water etc. from an implant material, and making moisture remove by natural seasoning etc. The concentration of this peptide in the solution or dispersion liquid containing cellular adhesiveness peptide, Based on the weight of this solution or these dispersion liquid, it is desirable in 1000mg/g or less, Preferably especially 100 or less mg/g still more preferably Ten or less mg/g, It is 1 or less mg/g most preferably, and, as for more than 0.001microg/g, more than 0.1microg/g is [ more than 0.01microg/g ] 1 micro more than/g most preferably especially preferably still more preferably.

[0028]

As a method of carrying out a chemical bond to an implant material, cellular adhesiveness peptide, When an implant material is plastic material, a method of making esterify or amide and carrying out washing desiccation by contacting cellular adhesiveness peptide to an implant material, for example under existence of N-imide hydroxysuccinate or a carbodiimide, etc. can be applied. After an implant material made a silane coupling agent or a titanium coupling agent react to an implant material in the case of a ceramics material or a metallic material, A method of making this silane coupling agent or a titanium coupling agent, and cellular adhesiveness peptide constructing a bridge with glutaraldehyde, and carrying out washing desiccation etc. are applicable. A reactional solvent may be used in these cases, and a publicly known thing can be used as a reactional solvent, for example, water, lithium bromide solution, lithium perchlorate solution, acetone, dimethylacetamide, a tetrahydrofuran, etc. are mentioned. No used cellular adhesiveness peptide



has to carry out a chemical bond, and the part may be carrying out physical adsorption. When combining cellular adhesiveness peptide chemically, as a functional group which participates in a chemical reaction, a carboxyl group, an amino group, a hydroxyl group, etc. are mentioned.

[0029]

When using a reactional solvent, the concentration of cellular adhesiveness peptide, Based on the total weight of cellular adhesiveness peptide and a reactional solvent, it is desirable in 1000mg/g or less, Preferably especially 100 or less mg/g still more preferably Ten or less mg/g, It is 1 or less mg/g most preferably, and, as for more than 0.001microg/g, more than 0.1microg/g is [ more than 0.01microg/g ] 1 micro more than/g most preferably especially preferably still more preferably.

[0030]

The content of cellular adhesiveness peptide in the base material of this invention, Per unit surface area of an implant material and more than 0.1 ng/cm<sup>2</sup> are preferred, More than 1 ng/cm<sup>2</sup> preferably especially still more preferably More than 10 ng/cm<sup>2</sup>. It is more than 100 ng/cm<sup>2</sup> most preferably, and, below as for 100 mg/cm<sup>2</sup>, below 1 mg/cm<sup>2</sup> is [ below 10 mg/cm<sup>2</sup> ] below 100microg/cm<sup>2</sup> most preferably especially preferably still more preferably. Although the measuring method in particular of the content of cellular adhesiveness peptide per unit surface area is not limited, immunoassay can be used, for example. The portion of (others on a vinyl tape etc. on a part of surface (for example, the shape of a square (0.5 cm x 0.5 cm) or a circle configuration 0.6 cm in diameter) of an implant material For example, wrap), The content of cellular adhesiveness peptide per unit surface area can be measured by making what carried out the sign of the enzyme (the following, enzyme labelled antibody) react to the antibody combined with cellular adhesiveness peptide, and measuring the amount of enzymes of this enzyme labelled antibody that reacted. The content of cellular adhesiveness peptide per unit surface area can also be measured by using an isotope, a pigment, a fluorescent substance, or photogene instead of an enzyme, carrying out a sign to an antibody, and measuring a dose of radiation, pigment quantity, fluorescence intensity, or luminescence intensity instead of the amount of enzymes. In the chemical bond to the implant material of cellular adhesiveness peptide, or the cellular adhesiveness peptide solution at the time of physical adsorption, The chemical bond front stirrup can make that in which the chemical bond rear stirrup deducted the amount of cellular adhesiveness peptide after physical adsorption from the amount of cellular adhesiveness peptide in front of physical adsorption the content of cellular adhesiveness peptide, and the content of cellular adhesiveness peptide per unit surface area can also be calculated by \*(ing) it with unit surface area. Unit surface area means the surface area of the surface which the cell cultured among the surfaces of a base material (B) can paste up. Here, although minute unevenness (for example, 1 micrometer or less) that a cell does not enter is dealt with as the flat surface, about that in which the rib (ridge) etc. are provided in order to raise a culture face product, the surface area of the rib is included in unit surface area.

[0031]

The cellular adhesiveness peptide content base material of this invention may perform sterilization treatment if needed. As a sterilizing method, radappertization, ethylene oxide gas

sterilization, plasma sterilization, gamma ray sterility, alcoholic sterilization, autoclave sterilization, hot-air sterilization, etc. are mentioned, for example. Autoclave sterilization and hot-air sterilization are [ among these ] preferred at a point with simple sterilization operation. As autoclave sterilization and cooking temperature in the case of sterilizing by hot air, not less than 60 °C not less than 40 °C is not less than 80 °C especially preferably desirable still more preferably, and 180 °C or less 160 °C or less is 140 °C or less especially preferably desirable still more preferably. As autoclave sterilization and cooking time in the case of sterilizing by hot air, 1 seconds or more are 1 minutes or more especially preferably 10 seconds or more desirable still more preferably, and 5000 or less minutes is 100 or less minutes especially preferably 500 or less minutes desirable still more preferably. As tub internal pressure in the case of carrying out autoclave sterilization, 0.002 or more MPa is 0.05 or more MPa especially preferably 0.01 or more MPa desirable still more preferably, and 5 or less MPa is 0.2 or less MPa especially preferably 1 or less MPa desirable still more preferably.

[0032]

Especially as a cell which can be pasted up on the cellular adhesiveness peptide content base material of this invention, the mammalian cell is suitable. As mammalian, Marsupialia (kangaroo etc.), Primates (an ape, a chimpanzee, Homo sapiens, etc.), Rodentia (a squirrel, a rat, a porcupine, etc.), Cetacea (a dolphin, a wooden key, a whale, etc.). The mammalian indicated in biology dictionaries [the Iwanami Shoten issue and 1969], such as Carnivora (a dog, a fox, a bear, a cat, a lion, and thora °C), Perissodactyla (a horse, an ass, SAI, etc.), and Artiodactyla (a wild boar, a swine, a camel, a deer, a cow, a goat, a sheep, etc.), is mentioned. Homo sapiens, a dog, a cat, a horse, a cow, and a swine are Homo sapiens desirable still more preferably among mammals. the cell (a vascular endothelial cell.) which participates in a blood vessel as a mammalian cell, for example Cells which participate in muscles, such as a smooth muscle cell and fibroblast (muscle cells etc.), The cells (fat cells etc.) which participate in a fat, the cell which participates in a nerve (nerve cell etc.), The cells (hepatocyte etc.) which participate in liver, the cell which participates in the pancreas (pancreas RA islet cell etc.), The cell which participates in the kidney (kidney epithelial cells, a proximal-tubular-epithelium cell, a mesangial cell, etc.), The cell which participates in a lung and a bronchial tube (epithelial cells, fibroblast, a vascular endothelial cell, and a smooth muscle cell), the cells (visual cells, corneal epithelial cells, an endothelium camerae anterioris cell, etc.) which participate in eyes, and the cell (epithelial cells.) which participates in a prostate gland An interstitial cell and a smooth muscle cell, the cells (osteoblast, osteocyte, an osteoclast, etc.) that participate in a bone, the cells (a chondroblast, chondrocyte, etc.) which participate in a cartilage, the cells (a periodontium cell and osteoblast) which participate in a gear tooth, and these stem cells are mentioned. The cells (osteoblast, osteocyte, an osteoclast, etc.) which participate in a bone among these cells, the cells (a chondroblast, chondrocyte, etc.) which participate in a cartilage, the cells (a periodontium cell and osteoblast) which participate in a gear tooth, and these stem cells (a mesenchymal stem cell, embryonic stem cells, etc.) are preferred.

[0033]

A lacking part in the living body can be equipped as it is like the usual implant material (it embeds), and also since the cellular adhesiveness peptide content base material of this invention pastes up

a cell in the outside of the body, a lacking part in the living body can also be equipped with it. The method of pasting up with a conventional method, for example, carrying out a cell culture as the method of pasting up a cell in the outside of the body, using a cellular adhesiveness peptide content base material, a cell, a culture medium, etc. of this invention, etc. are applicable. The cell content (cells/cm<sup>2</sup>) after pasting up a cellular adhesiveness peptide content base material and a cell, Ten or more [ per unit surface area of a cellular adhesiveness peptide content base material ] are 1000 or more especially preferably 100 or more desirable still more preferably, and, below as for 10<sup>9</sup>, below 10<sup>8</sup> is below 10<sup>7</sup> especially preferably desirable still more preferably. cells expresses the number of a cell and is easily measured with a blood cell count board etc.

[0034]

As a culture medium used for the cell culture at the time of pasting up a cellular adhesiveness peptide content base material and a cell, The publicly known thing etc. which are not limited but are especially used for a cell culture can be used. For example, a MEM culture medium, a BME culture medium, a DME culture medium, alphaMEM culture medium, an IMEM culture medium, A culture medium given in technical third edition" of tissue cultures edited by Asakura Publishing issue "Japan Tissue Culture Association, such as ES culture medium, DM-160 culture medium, a Fisher culture medium, F12 culture medium, WE culture medium, and a RPMI culture medium, The culture medium of marketing of ASF103 by Ajinomoto Co., Inc., the ASF104, the ASF301, Gibco CHO-SFM, the VP-SFM, the Opti-Pro, etc., etc., etc. are used. These culture media can be made to contain publicly known additive agents, such as cell growth factors (BMP, IGF, EGF, FGF, etc.), antimicrobial agents (amphotericin B, gentamycin, penicillin, streptomycin, etc.), and blood serums (human serum, bovine serum, horse serum, a sheep blood serum, etc.).

[0035]

When using a cell growth factor, concentration of a cell growth factor is the full capacity (a cell growth factor, an antimicrobial agent, and a blood serum are included.) of a culture medium. It is the same as that of the following. It hits, and 10 or more pg/L is 100 or more pg/L especially preferably 30 or more pg/L desirable still more preferably, and below 1,000microg/L is below 100microg/L especially preferably below 300microg/L desirable still more preferably. As for concentration of an antimicrobial agent, when using an antimicrobial agent, 1 or more ng/L per full capacity of a culture medium is preferred, Still more preferably, 3 or more ng/L, it is 10 or more ng/L. especially preferably, and 100 g/L or less of 30 g/L or less is 10 g/L or less especially preferably desirable still more preferably. When using a blood serum, concentration of a blood serum from viewpoints of the danger of infectious diseases, such as a virus, etc. Based on full capacity of a culture medium, more than 1x10<sup>-6</sup> is desirable still more preferred, as for more than 1x10<sup>-5</sup>, it is more than 1x10<sup>-4</sup> especially preferably, and 50 or less are two or less especially preferably ten or less desirable still more preferably. Temperature of a cell culture will not be limited especially if a cell is the temperature which can be grown good, but it is usually about 15-45 \*\*. A period of a cell culture will not be limited especially if a cell is a period which can be grown good, but it is usually about one to 30 days.

[0036]

the cellular adhesiveness peptide content base material of this invention --- artificial organs (for

example, an artificial heart, an artificial lung, an artificial kidney, an artificial liver, etc.) — business — it is suitable as medical-application base materials, such as a base material, a base material for dentistry, a base material for orthopedics, and a base material for ophthalmology, etc. That is, the cellular adhesiveness peptide content material of this invention is usually used temporarily or semipermanently within and without a living body as a substitute of a living body lacking part. Are suitable for especially the method that at least a part of this base material is detained in the living body, and is used, For example, a dental implant, a crown, an artificial bone, an artificial skull, artificial auditory ossicle, an artificial jaw, It is suitable for the use of medical equipment, such as embedding apparatus in the living body, such as endermic embedding apparatus, such as a bone substitution material, artificial joint, artificial cartilage, and \*\*\*\* anchoring material, an artificial valve, an artificial blood vessel, and dialysis shunt, and a pacemaker, and detention apparatus in the living body, etc. It is [ among these ] suitable by the dental implant and the artificial bone.

[0037]

[Working example]

Although an embodiment is hung up over below and this invention is explained to it in more detail, this invention is not limited only to these embodiments.

<Embodiment 1>

(1) Preparation of cellular adhesiveness artificial peptide (SLPF)

According to the method of given [ in JP,H3-502935,A ] in an embodiment, it has respectively Arg Gly Asp arrangement and about 12<sub>3</sub> (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (35), Peptide "SLPF" of the number average molecular weight 100,000 [ about ] was manufactured with transgenics Escherichia coli. The sample liquid which dissolved in 1.00mL of endotoxin test service water (distilled water), and prepared 1.00 mg of SLPF, or 0.100 mg, According to the directions for use of the reagent kit for Limulus tests, the endotoxin content of SLPF was measured using RIMURUSU ES-2 single Test Wako (the reagent kit for Limulus tests, the WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES LTD. make). As a result, they were 0.015 or more EU/mg and less than 0.15 EU/mg.

[0038]

(2) Adsorption to an implant material of SLPF

1 mg of SLPF was dissolved in 1mL of 4.5M lithium perchlorate solution, it diluted with 0.02M and pH 7.2 phosphate buffer solution (the following, PBS) which contain 99.5weight % of sodium chloride at 0.85 weight % 100 times further, and SLPF solution (10microg/mL) was produced. 50mL of this SLPF solution (10microg/mL), and a dental implant (trade name: — AQB implant.) One of hydroxyapatite coating unalloyed titanium 4 mm in diameter and a product made from an incorporated company advance was supplied to a glass beaker, standing was carried out at 25 \*\* for 2 hours, and SLPF was made to stick to a dental implant. Then, picked out a dental implant from a glass beaker, distilled water of 100mL washed 5 times, it was made to dry in a 37 \*\* fair wind dryer for 12 hours, and a SLPF adsorption dental implant (the base material A) was produced (SLPF coating weight: about 1microg/cm<sup>2</sup>).

[0039]

<Embodiment 2>

A sterilization SLPF adsorption dental implant (the base material B) was produced by carrying out autoclave sterilization (120 \*\*, 20 minutes) of the base material A of Embodiment 1. After carrying out autoclave sterilization (120 \*\*, 20 minutes) of the 10 mg of SLPF, this was dissolved in 1.00mL of endotoxin test service water, and it was considered as sample liquid. As a result of measuring endotoxin content of SLPF like Embodiment 1 using this sample liquid, it was less than 0.0015 EU/mg.

[0040]

#### <Embodiment 3>

##### (1) Preparation of cellular adhesiveness artificial peptide (SLPL)

According to a method of given [ in JP,H3-502935,A ] in an embodiment, it has respectively Ile Lys Val Ala Val arrangement (7) and about 12 , (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) arrangement (35), Peptide "SLPL" of the number average molecular weight 100,000 [ about ] was manufactured with transgenic Escherichia coli. 1.00 mg of SLPL or 0.100 mg was dissolved in 1.00mL of endotoxin test service water (distilled water), and it was considered as sample liquid. Endotoxin content of SLPL was measured like Embodiment 1 using this sample liquid. As a result, they were 0.015 or more EU/mg and less than 0.15 EU/mg.

[0041]

##### (2) Adsorption to an implant material of SLPL

1 mg of SLPL was dissolved in 1mL of 4.5M lithium perchlorate solution, it diluted with 0.02M and pH 7.2 phosphate buffer solution (the following, PBS) which contain 99.5weight % of sodium chloride at 0.85 weight % 100 times further, and SLPL solution (10microg/mL) was produced. 50mL of this SLPL solution (10microg/mL), and a dental implant (trade name: — AQB implant.) One of hydroxyapatite coating unalloyed titanium 4 mm in diameter and a product made from an incorporated company advance was supplied to a glass beaker, standing was carried out at 25 \*\* for 2 hours, and SLPL was made to stick to a dental implant. Then, picked out a dental implant from a glass beaker, distilled water of 100mL washed 5 times, it was made to dry in a 37 \*\* fair wind dryer for 12 hours, and a SLPL adsorption dental implant (the base material C) was produced (SLPL coating weight: about 1microg/cm<sup>2</sup>).

[0042]

#### <Embodiment 4>

The sterilization SLPL adsorption dental implant (base material D) was produced by carrying out autoclave sterilization (120 \*\*, 20 minutes) of the base material C of Embodiment 3. After carrying out autoclave sterilization (120 \*\*, 20 minutes) of the 10 mg of SLPL, this was dissolved in 1.00mL of endotoxin test service water, and it was considered as sample liquid. As a result of measuring the endotoxin content of SLPL like Embodiment 1 using this sample liquid, it was less than 0.0015 EU/mg.

[0043]

#### <Comparative example 1>

##### (1) Preparation of collagen

Bovine origin collagen (trade name: the collagen type 1, a cow, the Nippon Becton Dickinson, Inc. make, COL) was used as it was. 1.00 mg of COL or 0.100 mg was dissolved in 1.00mL of

endotoxin test service water, and it was considered as sample liquid. As a result of measuring the endotoxin content of COL like Embodiment 1 using this sample liquid, they were 0.015 or more EU/mg and less than 0.15 EU/mg.

[0044]

(2) Adsorption to the implant material of COL

1 mg of COL was dissolved in 100mL of 0.05N hydrochloric acid aqueous solution, and COL solution (10microg/mL) was produced. 50mL of this COL solution and 1 of the dental implant (trade name: the AQB implant, hydroxyapatite coating unalloyed titanium 4 mm in diameter, product made from an incorporated company advance) were supplied to the glass beaker, standing was carried out at 25 \*\* for 2 hours, and COL was made to stick to a dental implant. Then, picked out the dental implant from the glass beaker, the distilled water of 100mL washed 5 times, it was made to dry in a 37 \*\* fair wind dryer for 12 hours, and the COL adsorption dental implant (base material E) was produced (COL coating weight: about 1microg/cm<sup>2</sup>).

[0045]

<Comparative example 2>

The sterilization SLPF adsorption dental implant (base material F) was produced by carrying out autoclave sterilization (120 \*\*, 20 minutes) of the base material E of the comparative example 1. 10.0 mg of COL or 1.00 mg were dissolved in 1mL of endotoxin test service water, and it was considered as sample liquid. As a result of measuring the endotoxin content of COL like Embodiment 1 using this sample liquid, they were 0.0015 or more EU/mg and less than 0.015 EU/mg.

[0046]

<Evaluation 1>

The cellular adhesiveness of osteoblast was evaluated by the following methods about the base material A of Embodiment 1, the base material B of Embodiment 2, the base material C of Embodiment 3, the base material D of Embodiment 4, and the base material E of the comparative example 1 and the base material F of the comparative example 2. To 15mL capacity centrifugation tube (made by ASAHI TECHNO GLASS CORPORATION), one of a base material. 200,000 of 5mL of an osteoblast proliferation culture medium (made by Sanko Junyaku, Inc.) and normal Homo sapiens osteoblast (made by Sanko Junyaku, Inc.) were supplied, and it covered, settled after stirring and into CO<sub>2</sub> incubator gently, and cultivated on 5% (v/v) of CO<sub>2</sub> concentration, and 37 \*\* conditions for 2 hours. The base material was picked out from 15mL capacity centrifugation tube after culture of 2 hours, the base material, and the trypsin / EDTA solution of 5mL (made by KURASHIKI BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) was fed into another 15mL capacity centrifugation tube, and exfoliation processing of osteoblast was performed. The base material was picked out from 15mL capacity centrifugation tube after processing, and the solution which remained in 15mL capacity centrifugation tube was centrifuged on condition of for 5 minutes at 1000 rpm. Suction removal of the centrifugal supernatant liquid was carried out with the aspirator after centrifugal separation. The tetra color one (made by SEIKAGAKU CORPORATION) of PBS of 0.5mL and 0.1mL was supplied to 15mL capacity centrifugation tube after supernatant liquid removal, and standing was carried out to it at 25 \*\* for 4 hours. Then, the absorbance of 450 nm

(contrast wavelength of 630 nm) was measured using the spectrophotometer, and this value was made into cellular adhesiveness. These results are shown in Table 1.

[0047]

[Table 1]

# ヒト骨芽細胞の細胞接着性

		人工歯根に吸着された 細胞接着性ペプチド	滅菌処理の有無	細胞接着性 (450nm吸光度)
実施例	1	SLPF (人工)	無し	0.36
	2		有り	0.36
実施例	3	SLPL (人工)	無し	0.32
	4		有り	0.33
比較例	1	COL (ウシ由来)	無し	0.29
	2		有り	0.21

[0048]

<Evaluation 2>

The cellular adhesiveness of a microvascular endothelial cell was evaluated by the following methods about the base material A of Embodiment 1, the base material B of Embodiment 2, and the base material E of the comparative example 1 and the base material F of the comparative example 2. To 15mL capacity centrifugation tube (made by ASAHI TECHNO GLASS CORPORATION), one of a base material. 5mL of a microvascular endothelial cell growth medium (made by KURASHIKI BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) and 200,000 of a normal human microvascular endothelial cell (made by KURASHIKI BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) are supplied. It covered, settled after stirring and into CO<sub>2</sub> incubator gently, and cultivated on 5% (v/v) of CO<sub>2</sub> concentration, and 37 \*\* conditions for 2 hours. A base material was picked out from 15mL capacity centrifugation tube after culture of 2 hours, the base material, and the trypsin / EDTA solution of 5mL (made by KURASHIKI BOSEKI KABUSHIKI KAISHA) was fed into another 15mL capacity centrifugation tube, and exfoliation processing of a microvascular endothelial cell was performed. A base material was picked out from 15mL capacity centrifugation tube after processing, and a solution which remained in 15mL capacity centrifugation tube was centrifuged on condition of for 5 minutes at 1000 rpm. Suction removal of the centrifugal supernatant liquid was carried out with an aspirator after centrifugal separation. Tetra color one (made by SEIKAGAKU CORPORATION) of PBS of 0.5mL and 0.1mL was supplied to 15mL capacity centrifugation tube after supernatant liquid removal, and standing was carried out to it at 25 \*\*

for 4 hours. Then, an absorbance of 450 nm (contrast wavelength of 630 nm) was measured using a spectrophotometer, and this value was made into cellular adhesiveness. These results are shown in Table 2.

[0049]

[Table 2]

# ヒト微小血管内皮細胞の細胞接着性

		人工歯根に吸着された細胞接着性ペプチド	滅菌処理の有無	細胞接着性 (450nm吸光度)
実施例	1	SLPF (人工)	無し	0.23
	2		有り	0.24
比較例	1	COL (ウシ由来)	無し	0.13
	2		有り	0.07

[0050]

From the result of Table 1 and 2, the cellular adhesiveness peptide content base material of this invention is understood that adhesion activity is very high compared with the base material of a comparative example. It turns out that adhesion activity does not change even if the base material of this invention performs autoclave sterilization.

[0051]

[Effect of the Invention]

Even if collagen of natural origin, etc. are not used for the cellular adhesiveness peptide content base material of this invention, it can paste up a cell on a base material very efficiently. Heat sterilization of autoclave sterilization etc. is possible for the base material of this invention. Therefore, since the cellular adhesiveness peptide content base material of this invention can be further heat-sterilized easily excluding the protein of natural origin with the danger that infection substances, such as prion and a virus of the Homo sapiens infectiosity, contain, etc. even if mixing of a microorganism arises, its safety is very high. Since it is easy to paste up a cell on a base material, the compatibility of a base material and a cell in the living body becomes very high.



(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-471

(P2004-471A)

(43) 公開日 平成16年1月8日 (2004.1.8)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A61L 27/00	A61L 27/00 Y	4B024
A61L 24/00	C12N 11/14	4B033
C12N 11/14	A61L 25/00 ZNAA	4C081
// C07K 14/00	C12N 15/00 A	4H045
C12N 15/00	C07K 14/00	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2003-8813 (P2003-8813)	(71) 出願人	000002288
(22) 出願日	平成15年1月16日 (2003.1.16)		三洋化成工業株式会社
(31) 優先権主張番号	特願2002-9087 (P2002-9087)		京都府京都市東山区一橋野本町11番地の1
(32) 優先日	平成14年1月17日 (2002.1.17)	(72) 発明者	黒川 祐人
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		京都市東山区一橋野本町11番地の1 三洋化成工業株式会社内
		Fターム (参考)	4B024 AA01 BA80 CA05 DA06 4B033 NA16 NB22 NC04 ND12 4C081 AC04 BA14 BA15 CA242 CD112 CG02 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 EA20 FA74

(54) 【発明の名称】 細胞接着性ペプチド含有基材

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 プリオンやヒト感染性のウイルス等の感染物質が含有される危険性がなく、細胞を効率よく接着させることができる細胞接着性ペプチド含有基材の提供。

【解決手段】 エンドトキシンの含有量が細胞接着性ペプチドの重量に基づいて0.15 EU/mg以下である細胞接着性人工ペプチドとインプラント材料とからなることを特徴とする細胞接着性ペプチド含有基材を用いる。特に細胞接着性人工ペプチドが、Arg-Gly-Asp、Leu-Asp-Val、Arg-Glu-Asp-Val、Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg、Pro-Asp-Ser-Gly-Arg、Arg-Tyr-Val-Val-Leu-Pro-Arg、Leu-Gly-Thr-Ile-Pro-Gly、Arg-Asn-Ile-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ile、Ile-Lys-Val-Ala-Val、Leu-Arg-Glu-Asp-Gly-Glu-Ala、Gly-Val-Lys-Gly-Asp-Lys-Gly-Asn-Pro-Gly-Trp-Pro-Gly-Ala-Pro、Gly-Glu-Phe-Tyr-Phe-Asp-Leu-Arg-Leu-Lys-Gly-Asp-Lys、His-Ala-Val及びTyr-Lys-Leu-Asn-Val-Asn-Asp-Serからなる群より選ばれる少なくとも1種の最小アミノ酸配列を含んでなることが好ましい。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

エンドトキシンの含有量が細胞接着性ペプチドの重量に基づいて0.15 EU/mg未満である細胞接着性人工ペプチドとインプラント材料とからなることを特徴とする細胞接着性ペプチド含有基材。

## 【請求項2】

細胞接着性人工ペプチドが、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)、Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro配列(9)、Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys配列(10)、His Ala Val配列及びTyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser配列(11)からなる群より選ばれる少なくとも1種の最小アミノ酸配列(X)を含んでなる請求項1記載の基材。

## 【請求項3】

細胞接着性人工ペプチドが、さらにGly Ala Gly Ala Gly Ser配列(12)及び/又はGly Val Gly Val Pro配列(13)を含んでなる請求項1又は2記載の基材。

## 【請求項4】

インプラント材料がチタン原子を有してなる請求項1～3いずれか記載の基材。

## 【請求項5】

血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、筋肉細胞、脂肪細胞、神経細胞、肝実質細胞、膵ラ島細胞、腎上皮細胞、近位尿細管上皮細胞、メサングウム細胞、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、視細胞、角膜上皮細胞、角膜内皮細胞、間質細胞、平滑筋細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、軟骨芽細胞、軟骨細胞、歯根膜細胞、骨芽細胞及びこれらの幹細胞からなる群より選ばれる少なくとも1種の細胞を接着させるための請求項1～4いずれかに記載の基材。

## 【請求項6】

人工臓器用基材、歯科用基材、整形外科用基材又は眼科用基材に用いる請求項1～5いずれかに記載の基材。

## 【請求項7】

エンドトキシンの含有量が細胞接着性ペプチドの重量に基づいて0.15 EU/mg未満である細胞接着性人工ペプチドとインプラント材料とからなる細胞接着性ペプチド含有基材と、細胞とを接着させる工程を含むことを特徴とする細胞接着方法。

## 【請求項8】

細胞が、血管内皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、筋肉細胞、脂肪細胞、神経細胞、肝実質細胞、膵ラ島細胞、腎上皮細胞、近位尿細管上皮細胞、メサングウム細胞、上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、視細胞、角膜上皮細胞、角膜内皮細胞、間質細胞、平滑筋細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、軟骨芽細胞、軟骨細胞、歯根膜細胞、骨芽細胞及びこれらの幹細胞からなる群より選ばれる少なくとも1種の細胞である請求項7記載の細胞接着方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞接着性ペプチド含有基材に関する。さらに詳しくは、インプラント用基材

として最適な細胞接着性ペプチド含有基材に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞接着性ペプチド含有基材として、天然由来のコラーゲンと生体埋め込み用金属チタンとからなる細胞接着性ペプチド含有基材が知られている（特開平8-332217号公報）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

従来の細胞接着性ペプチド含有基材は、天然由来の蛋白質を用いるため蛋白質中にプリオンやヒト感染性のウイルス等の感染物質が含有される危険性があるという問題点がある。さらに細胞接着性が低いという問題もある。すなわち、本発明の目的は、天然由来の蛋白質を使用せず、細胞接着性の高い細胞接着性ペプチド含有基材を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、鋭意研究を重ねてきた結果、特定のペプチドを使用することにより上記目的を達成することを見だし本発明に到達した。すなわち、本発明の細胞接着性ペプチド含有基材の特徴は、エンドトキシンの含有量が細胞接着性ペプチドの重量に基づいて0.15 EU/mg未満である細胞接着性人工ペプチドとインプラント材料とからなる点にある。

【0005】

【発明の実施の形態】

細胞接着性人工ペプチドは、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(X)を含んでいる。なお、「細胞接着性」とは、特定の最小アミノ酸配列(X)が細胞のインテグリンレセプターに認識され細胞が基材に接着しやすくなる性質を意味する（大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年）。細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列(X)としては、例えば、「病態生理、第9巻 第7号、527～535頁、1990年」や「大阪府立母子医療センター雑誌、第8巻 第1号、58～66頁、1992年」に記載されているもの等が用いられる。

【0006】

これらの最小アミノ酸配列(X)の中で、Arg Gly Asp配列、Leu Asp Val配列、Arg Glu Asp Val配列(1)、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)、Pro Asp Ser Gly Arg配列(3)、Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg配列(4)、Leu Gly Thr Ile Pro Gly配列(5)、Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile配列(6)、Ile Lys Val Ala Val配列(7)、Leu Arg Glu配列、Asp Gly Glu Ala配列(8)、Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro配列(9)、Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys配列(10)、His Ala Val配列及びTyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser配列(11)が好ましい。細胞接着性の観点から、さらに好ましくはArg Gly Asp配列、Tyr Ile Gly Ser Arg配列(2)及びIle Lys Val Ala Val配列(7)であり、特に好ましくはArg Gly Asp配列である。なお、アミノ酸配列は3文字表記で現し、( )内にアミノ酸配列表に対応する配列番号を記載する（以下、同じである。）。

【0007】

細胞接着性人工ペプチドは、前記最小アミノ酸配列(X)を1分子中に少なくとも1個有すればよいが、細胞接着性の観点から、1分子中に2～50個有するものが好ましく、さらに好ましくは1分子中に3～30個、特に好ましくは1分子中に5～20個有するものである。また、2種以上の配列が1分子中に含まれてもよい。

## 【0008】

細胞接着性人工ペプチドの数平均分子量は、3,000,000以下が好ましく、さらに好ましくは1,000,000以下、特に好ましくは300,000以下であり、また300以上が好ましく、さらに好ましくは1,000以上、特に好ましくは3,000以上である。なお、細胞接着性人工ペプチドの数平均分子量は、SDS-PAGE (SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動) 法で、細胞接着性人工ペプチドを分離し、泳動距離を標準物質と比較することによって求めるものである (以下、同じである。)

## 【0009】

細胞接着性人工ペプチドとしては、例えば、Arg Gly Asp Ser配列 (14) からなるペプチド、Gly Arg Gly Asp Ser配列 (15) からなるペ 10  
 プチド、Gly Arg Gly Asp Ser Pro配列 (16) からなるペプチド、Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro配列 (17) からなるペプチド、Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala (18) からなるペプチド、Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser (19) からなるペプチド、Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg (20) からなるペプチド、Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp (21) からなるペプチド及びこれらの少なくとも一種のペプチドからなる重合体等が例示できる。重合体としては、例えば、(Arg Gly Asp Ser)<sub>4</sub>配列 (22)、(Arg Gly Asp Ser)<sub>6</sub>配列 (23)、(Arg Gly Asp Ser)<sub>8</sub>配列 (24)、(Gly Arg Gly Asp Ser)<sub>8</sub> (25)、(Gly Arg Gly Asp Ser Pro)<sub>8</sub> (26)、(Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro)<sub>4</sub> (27)、(Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala)<sub>4</sub> (28)、(Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser)<sub>4</sub> (29)、(Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg)<sub>4</sub> (30)、又は (Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp)<sub>4</sub> (31) からなるペプチド等が挙げられる。該重合体の重合度は、2~50が好ましく、さらに好ましくは3~30、特に好ましくは4~20、最も好ましくは4~16である。

## 【0010】

細胞接着性人工ペプチドのアミノ酸配列が、細胞接着シグナルを現わす最小アミノ酸配列 (X) 以外のアミノ酸配列 (Y) として、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (12)、Gly Val Gly Val Pro配列 (13)、Gly Pro Pro配列、Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly 配列 (32)、Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln配列 (33) 及び/ 又は Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro配列 (34) をさらに有してなることは、熱に対する安定性が増し、細胞接着性人工ペプチドや細胞接着性ペプチド含有基材をオートクレーブ等の熱滅菌にかけやすくなるために好ましい。これらアミノ酸配列 (Y) のうち、Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (12)、Gly Val Gly Val Pro配列 (13) 及び Gly Pro Pro配列が好ましく、さらに好ましくは Gly Ala Gly Ala Gly Ser配列 (12) である。細胞接着性人工ペプチドがアミノ酸配列 (Y) を有してなる場合、アミノ酸配列 (Y) の含有量は、熱に対する安定性の観点から、細胞接着性人工ペプチドの1分子中に、3~10、 50

000個有するものが好ましく、さらに好ましくは1分子中に10～3,000個、特に好ましくは1分子中に30～1,000個有するものである。

#### 【0011】

細胞接着性人工ペプチド中のアミノ酸配列(X)とアミノ酸配列(Y)との個数の比率[(X)/(Y)]は、0.002以上が好ましく、さらに好ましくは0.01以上、特に好ましくは0.05以上であり、また、10以下が好ましく、さらに好ましくは2以下、特に好ましくは0.5以下である。また、細胞接着性人工ペプチドがβターン構造を取りやすい観点から、アミノ酸配列(X)とアミノ酸配列(Y)とが交互に位置することが好ましい。

#### 【0012】

アミノ酸配列(Y)を有してなる細胞接着性人工ペプチドとしては、例えば、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(35)とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(35)とTyr Ile Gly Ser Arg配列(2)とをそれぞれ約13個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(35)とIle Lys Val Ala Val配列(7)とをそれぞれ約12個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、(Gly Val Gly Val Pro)、配列(36)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)12配列(37)とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、及び(Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro)2(38)配列とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約6個ずつ有する数平均分子量約5万のペプチド等(例えば、特表平3-502935号公報及びハンドブック オブ バイオデグラダブル ポリマーズ(アブラハム著、ハーウッド アカデミック パブリッシャーズ発行、アムステルダム1997; Abraham J. Dombら著、Handbook of Biodegradable Polymers, Harwood Academic Publisher s発行、Amsterdam 1997年)等)が挙げられる。

#### 【0013】

市場から入手できる細胞接着性人工ペプチドとしては、商品名を記載すると例えば、RGDS [Arg Gly Asp Ser配列(14)からなるペプチド、数平均分子量約400、(株)ペプチド研究所製]、GRGDS [Gly Arg Gly Asp Ser配列(15)からなるペプチド、数平均分子量約500、(株)ペプチド研究所製]、RetroNectin(リコンビナントヒトフィブロネクチンCH-296)[ヒトフィブロネクチン細胞接着シグナルであるCS1シグナルと細胞接着ドメインType I I I及びヘパリン結合ドメインI I Iを1つずつ有するペプチド、数平均分子量約6万、宝酒造(株)製]、RGDS-Protein A [Arg Gly Asp配列をProtein A(IgG結合ドメイン)に挿入したペプチド、数平均分子量約3万、宝酒造(株)製]、プロネクチンF [Arg Gly Asp配列と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(35)とを各々約12個有し、遺伝子組み換え大腸菌により製造されるペプチド、数平均分子量約10万、三洋化成工業(株)製]、プロネクチンFプラス[プロネクチンFをジメルアミノエチルクロライドと反応させて水可溶性にしたもの、三洋化成工業(株)製]、及びプロネクチンL [Ile Lys Val Ala Val配列(7)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)、配列(35)とを各々約12個有し、遺伝子組み換え大腸菌により製造されるペプチド、数平均分子量約10万、三洋化成工業(株)製]等が挙げられる。

#### 【0014】

細胞接着性人工ペプチドは、人工的に製造されるものであり、例えば、有機合成法(酵素法、固相合成法及び液相合成法等)、及び遺伝子組み換え法によって容易に製造できる。すなわち、細胞接着性人工ペプチドは、コラーゲンやフィブロネクチン等の天然の細胞接

10

20

30

40

50

着性ペプチドを含まず、また天然の細胞接着性ペプチドの一部をポリ-L-リジン等で修飾したものも含まない。有機合成法に関しては、例えば、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV（1981年7月1日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行）又は続生化学実験講座2、タンパク質の化学（下）（昭和62年5月20日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行）に記載されている方法等が適用できる。遺伝子組み換え法に関しては、例えば、特表平3-502935号公報に記載されている方法等が適用できる。なお、遺伝子組み換え法による場合、組み換え微生物由来の不純物を含むことがあるため、抗ペプチド抗体等を用いたアフィニティ精製等によって精製し、ペプチドの純度を80重量%以上にすることが好ましく、さらに好ましくは90重量%以上、特に好ましくは95重量%以上である。これらのうち、細胞接着性人工ペプチドのアミノ酸配列を容易に設計・製造できるという観点から、遺伝子組み換え法が好ましい。

#### 【0015】

有機合成法による細胞接着性人工ペプチドとしては、例えば、Arg Gly Asp Ser配列（14）、Gly Arg Gly Asp Ser配列（15）、Gly Arg Gly Asp Ser Pro配列（16）及びArg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro配列（17）からなる群より選ばれる少なくとも1種のアミノ酸配列を有するペプチド等が挙げられる。

#### 【0016】

遺伝子組み換え法による細胞接着性人工ペプチドとしては、例えば、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）、配列（35）とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）、配列（35）とTyr Ile Gly Ser Arg配列（2）とをそれぞれ約13個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）、配列（35）とIle Lys Val Ala Val配列（7）とをそれぞれ約12個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、（Gly Val Gly Val Pro）、配列（36）と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）12配列（37）とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約12個ずつ有する数平均分子量約10万のペプチド、及び（Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro）、（38）配列とArg Gly Asp配列とをそれぞれ約6個ずつ有する数平均分子量約5万のペプチド等が挙げられる。

#### 【0017】

細胞接着性ペプチド中のエンドトキシンの含有量（EU/mg）は、細胞接着性ペプチドの重量に基づいて、安全性の観点から、0.15未満が好ましく、さらに好ましくは0.015未満、特に好ましくは0.0015未満である。エンドトキシン含有量の測定方法としては、カプトガニの血球抽出液がエンドトキシニンに反応し凝固することを利用したリムルステスト方法等が適用できる。市場から容易に入手できるリムルステスト用試薬キットとして商品名で示すと、例えば、リムルスFシングルテストワコー（和光純薬工業株式会社製）及びリムルスES-2シングルテストワコー（和光純薬工業株式会社製）等が挙げられる。試薬キットに用いる検体液の調製は、細胞接着性ペプチドをエンドトキシン試験用水又は局方注射用水に溶解することにより行われる。また、標準物質としては、日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品、及びこのエンドトキシン標準品で検定された標準物質が使用できる。

#### 【0018】

市販のリムルステスト試薬キットを用いたエンドトキシン含有量の測定方法としては、例えば、1.00mgの測定試料（細胞接着性ペプチド）をエンドトキシン試験用水（蒸留水等）の1.00mLに溶解した検体液0.200mLを、LAL試薬（米国産カプトガニ（Limulus polyphemus）の血球抽出物を凍結乾燥したもの）の1本に投入して混合し、37℃で1時間静置後、水不溶性のゲルを形成するかどうかを目視判定する。ゲルが形成されるとエンドトキシン含有量が0.015EU/mg以上であると判

定でき、ゲルが形成されないとエンドトキシン含有量が $0.015 \text{ EU/mg}$ 未満であると判定できる。また、 $1.00 \text{ mg}$ の測定試料に替えて $0.100 \text{ mg}$ の測定試料を用いると、同様に含有量が $0.15 \text{ EU/mg}$ 以上か未満かの判定ができる。また、同様に $10.0 \text{ mg}$ の測定試料を用いることにより、 $0.0015 \text{ EU/mg}$ 以上か未満かの判定ができる。尚、ゲル形成が微妙なときなどは、日本薬局方で定められたエンドトキシン標準品、またはそのエンドトキシン標準品で検定された標準物質を対照として、目視判定、濁度測定、またはゲル未形成部分の液量測定等によって判定することができる。すなわち、 $0.15$ 未満とは、細胞接着性人工ペプチドのエンドトキシン試験用水溶液（濃度： $1 \text{ mg/mL}$ ）とLAL試薬（本）とを混合比 $0.200 \text{ mL/本}$ で混合したときゲルを生じないことを意味する。

10

#### 【0019】

インプラント材料に結合している細胞接着性人工ペプチドのエンドトキシン含有量を測定する方法としては、特に限定されないが、例えば、細胞接着性人工ペプチドがインプラント材料に化学結合している場合、インプラント材料をプロテアーゼ等の酵素溶液に投入し解離する細胞接着性人工ペプチドを、アフィニティクロマト等で酵素を除去して精製し凍結乾燥（例えば、 $-30^\circ\text{C}$ で凍結後、 $0.05 \text{ Pa}$ の減圧下、12時間かけて $25^\circ\text{C}$ に昇温し、さらに $25^\circ\text{C}$ で12時間減圧乾燥する。）させることにより細胞接着性人工ペプチドの粉末品を得て、上記エンドトキシン含有量の測定方法に従って測定することができる。細胞接着性人工ペプチドがインプラント材料に物理吸着している場合、インプラント材料を過塩素酸リチウム等の溶液に投入し解離する細胞接着性人工ペプチドを、透析膜を用いた透析等で過塩素酸リチウムを除去して精製し凍結乾燥（例えば、 $-30^\circ\text{C}$ で凍結後、 $0.05 \text{ Pa}$ の減圧下、12時間かけて $25^\circ\text{C}$ に昇温し、さらに $25^\circ\text{C}$ で12時間減圧乾燥する。）させることにより細胞接着性人工ペプチドの粉末品を得て、上記エンドトキシン含有量の測定方法に従って測定することができる。

20

#### 【0020】

エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁に含まれるため、細胞接着性ペプチドをグラム陰性菌による遺伝子組み換え法で製造した場合や、細胞接着性ペプチドを無菌環境以外で取り扱った場合に、エンドトキシンが細胞接着性ペプチドに混入されることがある。このような場合、細胞接着性ペプチドに混入したエンドトキシンを除去する方法としては、例えば、ゲル濾過カラム又は疎水性クロマトグラフィー用カラムを用いてエンドトキシンを分離するカラム法、オートクレーブ又は乾熱滅菌器等を用いて熱によってエンドトキシンを失活させる加熱法、及びこれらの方法の組合せ等が適用できる。これらのうち、滅菌操作が簡便でエンドトキシンの除去が確実な加熱法である。加熱温度としては、 $40^\circ\text{C}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $60^\circ\text{C}$ 以上、特に好ましくは $80^\circ\text{C}$ 以上であり、また、 $180^\circ\text{C}$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $160^\circ\text{C}$ 以下、特に好ましくは $140^\circ\text{C}$ 以下である。加熱時間は、1秒以上が好ましく、さらに好ましくは10秒以上、特に好ましくは1分以上であり、また、5000分以下が好ましく、さらに好ましくは500分以下、特に好ましくは100分以下である。

30

#### 【0021】

インプラント材料としては、例えば、セラミックス材料、金属材料及び有機高分子材料、及びこれらの二種以上を有する複合材料等が使用できる。

40

セラミックス材料としては、例えば、ヒドロキシアパタイト、リン酸カルシウム（リン酸三カルシウム（TCP）〔 $\beta$ -リン酸三カルシウム（ $\beta$ -TCP）等〕等）、バイオガラス（ $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ ）〔セラピタル（ $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O-MgO}$ ）等〕、CPSA〔 $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 〕ガラス繊維複合材、アパタイト-ウオラストナイト（A-W）ガラスセラミックス〔 $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-P}_2\text{O}_5$ 〕、アルミナ、ジルコニア、カーボン、チタニア、サファイア、炭化珪素、窒化珪素、及びこれらの二種以上を有する複合材料等（移植と人工臓器、岩波講座 現代医学の基礎14、株式会社岩波書店発行及び特開平7-88174号公報等）が挙げられる。これらのうち、ヒドロキシアパタイト、TCP、 $\beta$

50

ーTCP、バイオガラス、セラミタル、CPSAガラス繊維複合材、A-Wガラスセラミックス、アルミナ、及びジルコニアが好ましく、さらに好ましくはヒドロキシアパタイトである。

【0022】

金属材料としては、例えば、チタン、アルミニウム、コバルト、クロム、モリブデン、鉄、ニッケル、ジルコニウム、ニオブ、タンタル及びこれらを二種以上有する複合材料等が挙げられる（移植と人工臓器、岩波講座 現代医学の基礎14、株式会社岩波書店発行及び特開平7-88174号公報等）。複合材料としては、チタン合金（Ti-6Al-4V及びTi-6Al-2Nb-1Ta等）及びコバルトクロム合金等が挙げられる。これらのうち、チタン及びチタン合金が好ましい。

10

【0023】

有機高分子材料としては、例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリスチレン、ポリビニルアルコール、ポリプロピレン、ポリエチレン、及びこれらを二種以上有する複合材料等が挙げられる（移植と人工臓器、岩波講座 現代医学の基礎14、株式会社岩波書店発行及び特開平7-88174号公報等）。これらのうち、ポリメチルメタクリレート及びポリエチレンが好ましい。有機高分子材料の重量平均分子量（ゲルパーミエーションクロマトグラフィー法）は、25000万以下が好ましく、さらに好ましくは5000万以下、特に好ましくは1000万以下、また0.5万以上が好ましく、さらに好ましくは2万以上、特に好ましくは10万以上である。

【0024】

これらの二種以上を有する複合材料としては、例えば、セラミック材料と金属材料との複合材料（例えば、ヒドロキシアパタイトとチタンとの複合材料、 $\beta$ -TCPとチタンとの複合材料、及びA-Wガラスセラミックスとチタンとの複合材料等）、金属材料と有機高分子材料との複合材料（例えば、チタンとポリメチルメタクリレートとの複合材料、及びチタンとポリエチレンとの複合材料等）及びセラミック材料と金属材料と有機高分子材料との複合材料（例えば、ヒドロキシアパタイトとチタンとポリエチレンとの複合材料等）等が挙げられる（移植と人工臓器、岩波講座 現代医学の基礎14、株式会社岩波書店発行及び特開平7-88174号公報等）。

20

【0025】

これらのうち、セラミックス材料、金属材料、及びセラミックス材料と金属材料との複合材料が好ましく、さらに好ましくは金属材料、及びセラミックス材料と金属材料との複合材料、特に好ましくはチタン、ヒドロキシアパタイトとチタンとの複合材料、 $\beta$ -TCPとチタンとの複合材料及びA-Wガラスセラミックスとチタンとの複合材料である。これらの二種以上を有する複合材料の形態としては、セラミック材料を金属材料にコーティングしたもの、金属材料に有機高分子材料をネジ等で装着したもの、セラミック材料を金属材料にコーティングしたものに有機高分子材料をネジ等で装着したもの等が挙げられる（移植と人工臓器、岩波講座 現代医学の基礎14、株式会社岩波書店発行、及び特開平7-88174号公報等）。

30

【0026】

インプラント材料の形状としては、特に制限が無く、例えば、人工股関節の形状、人工膝関節の形状、人工歯根の形状、及び骨補・材料の形状など「移植と人工臓器（岩波講座 現代医学の基礎14）、株式会社岩波書店発行」等に記載の形状が挙げられる。

40

【0027】

本発明の細胞接着性ペプチド含有基材は、公知の方法により製造することができ、例えば、細胞接着性ペプチドをインプラント材料に物理吸着及び／又は化学結合させること等により製造することができる。細胞接着性ペプチドをインプラント材料に物理吸着させる方法としては、例えば、細胞接着性ペプチドを溶剤（例えば、水、エタノール、ジメチルスルホキシド又は過塩素酸リチウム水溶液等）等に溶解又は分散させた溶液又は分散液を、インプラント材料に接触（塗工、含浸又は混合等）させる方法等が適用できる。その後、インプラント材料から細胞接着性ペプチドの溶液又は分散液を水等で洗い流して、自然乾

50



燥等で水分を除去させることによって、インプラント材料に吸着させることができる。細胞接着性ペプチドを含有する溶液又は分散液中の該ペプチドの濃度は、該溶液又は該分散液の重量に基づいて、 $1000\text{ mg/g}$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $100\text{ mg/g}$ 以下、特に好ましくは $10\text{ mg/g}$ 以下、最も好ましくは $1\text{ mg/g}$ 以下であり、また $0.001\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $0.01\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上、特に好ましくは $0.1\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上、最も好ましくは $1\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上である。

#### 【0028】

細胞接着性ペプチドをインプラント材料に化学結合させる方法としては、インプラント材料がプラスチック材料の場合、例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミド又はカルボジイミド等の存在下で、インプラント材料に細胞接着性ペプチドを接触させることによりエステル化又はアミド化させ、洗浄乾燥させる方法等が適用できる。インプラント材料がセラミックス材料や金属材料の場合、シランカップリング剤又はチタンカップリング剤等をインプラント材料に反応させた後、このシランカップリング剤又はチタンカップリング剤と細胞接着性ペプチドとをグルタルアルデヒドで架橋させ、洗浄乾燥させる方法等が適用できる。なお、これらの場合、反応溶媒を使用してもよく、反応溶媒としては公知のものが使用でき、例えば、水、臭化リチウム水溶液、過塩素酸リチウム水溶液、アセトン、ジメチルアセトアミド及びテトラヒドロフラン等が挙げられる。また、使用したすべての細胞接着性ペプチドが化学結合する必要はなく、その一部分が物理吸着していてもよい。細胞接着性ペプチドを化学的に結合させる場合、化学反応に関与する官能基としては、カルボキシル基、アミノ基及び水酸基等が挙げられる。

#### 【0029】

反応溶媒を使用する場合、細胞接着性ペプチドの濃度は、細胞接着性ペプチドと反応溶媒との合計重量に基づいて、 $1000\text{ mg/g}$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $100\text{ mg/g}$ 以下、特に好ましくは $10\text{ mg/g}$ 以下、最も好ましくは $1\text{ mg/g}$ 以下であり、また、 $0.001\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $0.01\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上、特に好ましくは $0.1\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上、最も好ましくは $1\text{ }\mu\text{g/g}$ 以上である。

#### 【0030】

本発明の基材中の細胞接着性ペプチドの含有量は、インプラント材料の単位表面積あたり、 $0.1\text{ ng/cm}^2$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $1\text{ ng/cm}^2$ 以上、特に好ましくは $10\text{ ng/cm}^2$ 以上、最も好ましくは $100\text{ ng/cm}^2$ 以上であり、また、 $100\text{ mg/cm}^2$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $10\text{ mg/cm}^2$ 以下、特に好ましくは $1\text{ mg/cm}^2$ 以下、最も好ましくは $100\text{ }\mu\text{g/cm}^2$ 以下である。単位表面積あたりの細胞接着性ペプチドの含有量の測定方法は特に限定されないが、例えば、免疫学的測定法が利用できる。例えば、インプラント材料の表面の一部（例えば、 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ の正方形又は直径 $0.6\text{ cm}$ の円形状）のみに（他の部分はビニールテープ等で覆う）、細胞接着性ペプチドと結合する抗体に酵素を標識したもの（以下、酵素標識抗体）を反応させ、この反応した酵素標識抗体の酵素量を測定することにより、単位表面積あたりの細胞接着性ペプチドの含有量を測定することができる。また、酵素の代わりにアイソトープ、色素、蛍光物質又は発光物質等を用いて抗体に標識し、酵素量の代わりに放射線量、色素量、蛍光強度又は発光強度等を測定することにより、単位表面積あたりの細胞接着性ペプチドの含有量を測定することもできる。また、細胞接着性ペプチドのインプラント材料への化学結合又は物理吸着時の細胞接着性ペプチド溶液において、化学結合前又は物理吸着前の細胞接着性ペプチド量から、化学結合後又は物理吸着後の細胞接着性ペプチド量を差し引いたものを細胞接着性ペプチドの含有量とし、それを単位表面積で除することで、単位表面積あたりの細胞接着性ペプチドの含有量を求めることもできる。なお、単位表面積は、基材（B）の表面のうち、培養される細胞が接着し得る表面の表面積を意味する。ここで、細胞が入り込まないような微小な凹凸（例えば、 $1\text{ }\mu\text{m}$ 以下）は平坦な表面として取扱うが、培養面積を高める目的でリブ（畝）等が設けてあるものについてはそのリブの表面積を単位表面積に含める。

#### 【0031】

本発明の細胞接着性ペプチド含有基材は、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法としては、例えば、放射線滅菌、エチレンオキシドガス滅菌、プラズマ滅菌、 $\gamma$ 線滅菌、アルコール滅菌、オートクレーブ滅菌、及び乾熱滅菌等が挙げられる。これらのうち、滅菌操作が簡便な点で、オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌が好ましい。オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌する場合の加熱温度としては、 $40^{\circ}\text{C}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $60^{\circ}\text{C}$ 以上、特に好ましくは $80^{\circ}\text{C}$ 以上であり、また、 $180^{\circ}\text{C}$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $160^{\circ}\text{C}$ 以下、特に好ましくは $140^{\circ}\text{C}$ 以下である。オートクレーブ滅菌及び乾熱滅菌する場合の加熱時間としては、1秒以上が好ましく、さらに好ましくは10秒以上、特に好ましくは1分以上であり、また、5000分以下が好ましく、さらに好ましくは500分以下、特に好ましくは100分以下である。オートクレーブ滅菌する場合の槽内圧力としては、 $0.002\text{MPa}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $0.01\text{MPa}$ 以上、特に好ましくは $0.05\text{MPa}$ 以上であり、また、 $5\text{MPa}$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $1\text{MPa}$ 以下、特に好ましくは $0.2\text{MPa}$ 以下である。

#### 【0032】

本発明の細胞接着性ペプチド含有基材に接着できる細胞としては、哺乳動物細胞が特に適している。哺乳動物としては、有袋目（カンガルー等）、霊長目（サル、チンパンジー及びヒト等）、齧歯目（リス、ネズミ及びヤマアラシ等）、鯨目（イルカ、シャチ及びクジラ等）、食肉目（イヌ、キツネ、クマ、ネコ、ライオン及びトラ等）、奇蹄目（ウマ、ロバ及びサイ等）及び偶蹄目（イノシシ、ブタ、ラクダ、シカ、ウシ、ヤギ及びヒツジ等）等の生物学辞典〔岩波書店発行、1969年〕に記載されている哺乳動物が挙げられる。哺乳動物のうち、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ及びブタが好ましく、さらに好ましくはヒトである。哺乳動物細胞としては、例えば、血管に関与する細胞（血管内皮細胞、平滑筋細胞及び線維芽細胞等）、筋肉に関与する細胞（筋肉細胞等）、脂肪に関与する細胞（脂肪細胞等）、神経に関与する細胞（神経細胞等）、肝臓に関与する細胞（肝実質細胞等）、脾臓に関与する細胞（脾ラ島細胞等）、腎臓に関与する細胞（腎上皮細胞、近位尿細管上皮細胞及びメサングウム細胞等）、肺・気管支に関与する細胞（上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞及び平滑筋細胞）、目に関与する細胞（視細胞、角膜上皮細胞及び角膜内皮細胞等）、前立腺に関与する細胞（上皮細胞、間質細胞及び平滑筋細胞）、骨に関与する細胞（骨芽細胞、骨細胞及び破骨細胞等）、軟骨に関与する細胞（軟骨芽細胞及び軟骨細胞等）、歯に関与する細胞（歯根膜細胞及び骨芽細胞）、及びこれらの幹細胞が挙げられる。これらの細胞のうち、骨に関与する細胞（骨芽細胞、骨細胞及び破骨細胞等）、軟骨に関与する細胞（軟骨芽細胞及び軟骨細胞等）、歯に関与する細胞（歯根膜細胞及び骨芽細胞）、及びこれらの幹細胞（間葉系幹細胞及び胚性幹細胞等）が好ましい。

#### 【0033】

本発明の細胞接着性ペプチド含有基材は、通常のインプラント材料と同様にそのまま生体内の欠損部に装着（埋め込む等）することができる他、体外において細胞を接着させてから生体内の欠損部に装着することもできる。体外において細胞を接着させる方法としては、常法により接着させることができ、例えば、本発明の細胞接着性ペプチド含有基材、細胞及び培地等を用いて細胞培養する方法等が適用できる。細胞接着性ペプチド含有基材と細胞とを接着させた後の細胞含有量（ $\text{cells}/\text{cm}^2$ ）は、細胞接着性ペプチド含有基材の単位表面積当たり、10以上が好ましく、さらに好ましくは100以上、特に好ましくは1000以上であり、また $10^9$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $10^8$ 以下、特に好ましくは $10^7$ 以下である。なお、 $\text{cells}$ は細胞の個数を表し、血球計数板等によって容易に測定される。

#### 【0034】

細胞接着性ペプチド含有基材と細胞とを接着させる際の細胞培養に用いられる培地としては、特に限定されず、細胞培養に使用される公知のもの等が使用でき、例えば、MEM培地、BME培地、DME培地、 $\alpha$ MEM培地、IMEM培地、ES培地、DM-160培地、Fisher培地、F12培地、WE培地及びRPMI培地等の朝倉書店発行「日本組織培養学会編 組織培養の技術 第三版」に記載の培地や、味の素（株）製ASF10

10

20

30

40

50

3、同ASF104、同ASF301や、ギブコ社製CHO-SFM、同VF-SFM、同Opti-Pro等の市販の培地等が用いられる。これらの培地には、細胞増殖因子（BMP、IGF、EGF及びFGF等）、抗菌剤（アンホテリシンB、ゲンタマイシン、ペニシリン及びストレプトマイシン等）、血清（ヒト血清、ウシ血清、ウマ血清及びヒツジ血清等）等公知の添加剤を含有させることができる。

#### 【0035】

細胞増殖因子を使用する場合、細胞増殖因子の濃度は、培地の全容量（細胞増殖因子、抗菌剤及び血清を含む。以下同様。）当たり、 $10 \text{ pg/L}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $30 \text{ pg/L}$ 以上、特に好ましくは $100 \text{ pg/L}$ 以上であり、また $1,000 \text{ } \mu\text{g/L}$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $300 \text{ } \mu\text{g/L}$ 以下、特に好ましくは $100 \text{ } \mu\text{g/L}$ 以下である。抗菌剤を使用する場合、抗菌剤の濃度は、培地の全容量当たり、 $1 \text{ ng/L}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $3 \text{ ng/L}$ 以上、特に好ましくは $10 \text{ ng/L}$ 以上であり、また $100 \text{ g/L}$ 以下が好ましく、さらに好ましくは $30 \text{ g/L}$ 以下、特に好ましくは $10 \text{ g/L}$ 以下である。血清を使用する場合、血清の濃度は、ウイルス等の感染症の危険性等の観点から、培地の全容量に基づいて、 $1 \times 10^{-6}$ 以上が好ましく、さらに好ましくは $1 \times 10^{-5}$ 以上、特に好ましくは $1 \times 10^{-4}$ 以上であり、また50以下が好ましく、さらに好ましくは10以下、特に好ましくは2以下である。細胞培養の温度は、細胞が良好に生育できる温度であれば特に限定されず、通常 $15 \sim 45^\circ\text{C}$ 程度である。細胞培養の期間は、細胞が良好に生育できる期間であれば特に限定されず、通常1～30日程度である。

#### 【0036】

本発明の細胞接着性ペプチド含有基材は、人工臓器（例えば、人工心臓、人工肺、人工腎臓及び人工肝臓等）用基材、歯科用基材、整形外科用基材、及び眼科用基材等の医療用基材等として適している。すなわち、本発明の細胞接着性ペプチド含有材料は通常、生体欠損部の代替品として、生体の内外で一時的又は半永久的に使用される。また、この基材の少なくとも一部が生体内に留置されて用いられる方法に特に適しており、例えば、人工歯根、歯冠、人工骨、人工頭蓋骨、人工耳小骨、人工顎骨、骨置換材料、人工関節、人工軟骨、骨折固定用材料、人工弁、人工血管、透析用シャントなどの経皮埋入機器、ペースメーカーなどの生体内埋め込み機器、生体内留置機器などの医療機器等の用途に適している。これらのうち、人工歯根及び人工骨により適している。

#### 【0037】

##### 【実施例】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

##### <実施例1>

##### (1) 細胞接着性人工ペプチド（SLPF）の準備

特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、Arg Gly Asp配列と（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）配列（35）とを各々約12個有し、数平均分子量約10万のペプチド“SLPF”を遺伝子組み換え大腸菌により製造した。SLPFの $1.00 \text{ mg}$ 又は $0.100 \text{ mg}$ をエンドトキシン試験用水（蒸留水）の $1.00 \text{ mL}$ に溶解して調製した検体液と、リムルスES-2シングルテストワコー（リムルステスト用試薬キット、和光純薬工業株式会社製）とを用い、リムルステスト用試薬キットの使用説明書に従ってSLPFのエンドトキシン含有量を測定した。その結果、 $0.015 \text{ EU/mg}$ 以上かつ $0.15 \text{ EU/mg}$ 未満であった。

#### 【0038】

##### (2) SLPFのインプラント材料への吸着

SLPFの $1 \text{ mg}$ を $4.5 \text{ M}$ 過塩素酸リチウム水溶液の $1 \text{ mL}$ に溶解し、さらに、99.5重量%の塩化ナトリウムを0.85重量%で含有する $0.02 \text{ M}$ 、 $\text{pH} 7.2$ のリン酸緩衝液（以下、PBS）で100倍希釈して、SLPF水溶液（ $10 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ）を作製した。このSLPF水溶液（ $10 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ）の $50 \text{ mL}$ と人工歯根（商品名：AQBイ

ンプラント、直径4mmのヒドロキシアパタイトコーティング純チタン、株式会社アドバンス製)の1本とをガラスビーカーに投入し25℃で2時間静置させ、人工歯根にSLPFを吸着させた。その後、人工歯根をガラスビーカーから取り出し、100mLの蒸留水で5回洗浄し、37℃の順風乾燥機の中で12時間乾燥させ、SLPF吸着人工歯根(基材A)を作製した(SLPF付着量:約 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )。

【0039】

#### <実施例2>

実施例1の基材Aを、オートクレーブ滅菌(120℃、20分)することにより滅菌SLPF吸着人工歯根(基材B)を作製した。なお、SLPFの10mgをオートクレーブ滅菌(120℃、20分)した後、これをエンドトキシン試験用水の1.00mLに溶解して検体液とした。この検体液を用いて実施例1と同様にしてSLPFのエンドトキシン含有量を測定した結果、0.0015EU/mg未満であった。

【0040】

#### <実施例3>

##### (1)細胞接着性人工ペプチド(SLPL)の準備

特表平3-502935号公報中の実施例記載の方法に準じて、Ile Lys Val Ala Val配列(7)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)配列(35)とを各々約12個有し、数平均分子量約10万のペプチド"SLPL"を選伝子組み換え大腸菌により製造した。SLPLの1.00mg又は0.100mgをエンドトキシン試験用水(蒸留水)の1.00mLに溶解して検体液とした。この検体液を用いて実施例1と同様にしてSLPLのエンドトキシン含有量を測定した。その結果、0.015EU/mg以上かつ0.15EU/mg未満であった。

【0041】

##### (2)SLPLのインプラント材料への吸着

SLPLの1mgを4.5M過塩素酸リチウム水溶液の1mLに溶解し、さらに、99.5重量%の塩化ナトリウムを0.85重量%で含有する0.02M、pH7.2のリン酸緩衝液(以下、PBS)で100倍希釈して、SLPL水溶液( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ )を作製した。このSLPL水溶液( $10\mu\text{g}/\text{mL}$ )の50mLと人工歯根(商品名:AQBインプラント、直径4mmのヒドロキシアパタイトコーティング純チタン、株式会社アドバンス製)の1本とをガラスビーカーに投入し25℃で2時間静置させ、人工歯根にSLPLを吸着させた。その後、人工歯根をガラスビーカーから取り出し、100mLの蒸留水で5回洗浄し、37℃の順風乾燥機の中で12時間乾燥させ、SLPL吸着人工歯根(基材C)を作製した(SLPL付着量:約 $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )。

【0042】

#### <実施例4>

実施例3の基材Cを、オートクレーブ滅菌(120℃、20分)することにより滅菌SLPL吸着人工歯根(基材D)を作製した。なお、SLPLの10mgをオートクレーブ滅菌(120℃、20分)した後、これをエンドトキシン試験用水の1.00mLに溶解して検体液とした。この検体液を用いて実施例1と同様にしてSLPLのエンドトキシン含有量を測定した結果、0.0015EU/mg未満であった。

【0043】

#### <比較例1>

##### (1)コラーゲンの準備

ウシ由来コラーゲン(商品名:コラーゲンタイプ1,ウシ、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製、COL)をそのまま使用した。COLの1.00mg又は0.100mgをエンドトキシン試験用水の1.00mLに溶解して検体液とした。この検体液を用いて実施例1と同様にしてCOLのエンドトキシン含有量を測定した結果、0.015EU/mg以上かつ0.15EU/mg未満であった。

【0044】

##### (2)COLのインプラント材料への吸着

COLの1mgを0.05N塩酸水溶液の100mLに溶解し、COL水溶液(10 $\mu$ g/mL)を作製した。このCOL水溶液の50mLと人工歯根(商品名: AQBインプラント、直径4mmのヒドロキシアパタイトコーティング純チタン、株式会社アドバンス製)の1本とをガラスビーカーに投入し25℃で2時間静置させ、人工歯根にCOLを吸着させた。その後、人工歯根をガラスビーカーから取り出し、100mLの蒸留水で5回洗浄し、37℃の順風乾燥機の中で12時間乾燥させ、COL吸着人工歯根(基材E)を作製した(COL付着量: 約1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)。

【0045】

<比較例2>

比較例1の基材Eを、オートクレーブ滅菌(120℃、20分)することにより滅菌SLPF吸着人工歯根(基材F)を作製した。COLの10.0mg又は1.00mgをエンドトキシン試験用水の1mLに溶解して検体液とした。この検体液を用いて実施例1と同様にしてCOLのエンドトキシン含有量を測定した結果、0.0015EU/mg以上かつ0.015EU/mg未満であった。

【0046】

<評価1>

実施例1の基材A、実施例2の基材B、実施例3の基材C、実施例4の基材D、比較例1の基材E及び比較例2の基材Fについて、骨芽細胞の細胞接着性を以下の方法で評価した。15mL容量遠沈管(旭テクノグラス株式会社製)に、基材の1個、骨芽細胞増殖培地(三光純薬株式会社製)の5mL、及び正常ヒト骨芽細胞(三光純薬株式会社製)の20万個を投入し、フタをしてゆるやかに攪拌後、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に静置し、CO<sub>2</sub>濃度5%(v/v)、37℃の条件で2時間培養した。2時間の培養後、15mL容量遠沈管から基材を取り出し、その基材と5mLのトリプシン/EDTA溶液(倉敷紡績株式会社製)とを別の15mL容量遠沈管に投入し、骨芽細胞の剥離処理を行った。処理後、15mL容量遠沈管から基材を取り出し、15mL容量遠沈管に残存した溶液を1000rpmで5分間の条件で遠心分離した。遠心分離後、遠心上清をアスピレーターで吸引除去した。上清除去後の15mL容量遠沈管に、0.5mLのPBS及び0.1mLのテトラカラーワン(生化学工業株式会社製)を投入し、25℃で4時間静置させた。その後、分光光度計を用いて450nm(対照波長630nm)の吸光度を測定し、この値を細胞接着性とした。これらの結果を表1に示す。

【0047】

【表1】

ヒト骨芽細胞の細胞接着性

		人工歯根に吸着された 細胞接着性ペプチド	滅菌処理の有無	細胞接着性 (450nm吸光度)
実施例	1	SLPF(人工)	無し	0.36
	2		有り	0.36
実施例	3	SLPL(人工)	無し	0.32
	4		有り	0.33
比較例	1	COL(ウシ由来)	無し	0.29
	2		有り	0.21

【0048】

&lt;評価2&gt;

実施例1の基材A、実施例2の基材B、比較例1の基材E及び比較例2の基材Fについて、微小血管内皮細胞の細胞接着性を以下の方法で評価した。15 mL容量遠沈管（旭テクノグラス株式会社製）に、基材の1個、微小血管内皮細胞増殖培地（倉敷紡績株式会社製）の5 mL、及び正常ヒト微小血管内皮細胞（倉敷紡績株式会社製）の20万個を投入し、フタをしてゆるやかに攪拌後、CO<sub>2</sub>インキュベーター内に静置し、CO<sub>2</sub>濃度5%（v/v）、37℃の条件で2時間培養した。2時間の培養後、15 mL容量遠沈管から基材を取り出し、その基材と5 mLのトリプシン／EDTA溶液（倉敷紡績株式会社製）とを別の15 mL容量遠沈管に投入し、微小血管内皮細胞の剥離処理を行った。処理後、15 mL容量遠沈管から基材を取り出し、15 mL容量遠沈管に残存した溶液を1000 rpmで5分間の条件で遠心分離した。遠心分離後、遠心上清をアスピレーターで吸引除去した。上清除去後の15 mL容量遠沈管に、0.5 mLのPBS及び0.1 mLのテトラカラーワン（生化学工業株式会社製）を投入し、25℃で4時間静置させた。その後、分光光度計を用いて450 nm（対照波長630 nm）の吸光度を測定し、この値を細胞接着性とした。これらの結果を表2に示す。

【0049】

【表2】

ヒト微小血管内皮細胞の細胞接着性

		人工歯根に吸着された細胞接着性ペプチド	滅菌処理の有無	細胞接着性 (450 nm吸光度)
実施例	1	SLPF（人工）	無し	0.23
	2		有り	0.24
比較例	1	COL（ウシ由来）	無し	0.13
	2		有り	0.07

【0050】

表1及び表2の結果から、本発明の細胞接着性ペプチド含有基材は、比較例の基材に比べて接着活性が極めて高いことが判る。さらに、本発明の基材は、オートクレーブ滅菌を行っても接着活性が変化しないことが分かる。

【0051】

【発明の効果】

本発明の細胞接着性ペプチド含有基材は、天然由来のコラーゲン等を使用しなくても、細胞を極めて効率良く基材に接着できる。さらに、本発明の基材は、オートクレーブ滅菌等の加熱滅菌が可能である。従って、本発明の細胞接着性ペプチド含有基材は、プリオンやヒト感染性のウイルス等の感染物質が含有される危険性がある天然由来の蛋白質等を含まず、さらに、微生物の混入が生じたとしても容易に加熱滅菌できるため、極めて安全性が高い。また、細胞が基材に接着しやすいため、基材と体内細胞との親和性が極めて高くなる。

【0052】

【配列表】

(110) 三洋化成工業株式会社 ; SANYO CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

(120) 細胞接着性ペプチド含有基材

(130) P5832

(150) 特願2002-009067

(151) 2002-1-17

(160) 38

(210) 1

(211) 4

(212) PRT

(213) Homo sapiens

(400) 1

Arg Glu Asp Val

1

10

(210) 2

(211) 5

(212) PRT

(213) Homo sapiens

(400) 2

Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

20

30

(210) 3

(211) 5

(212) PRT

(213) Homo sapiens

(400) 3

Pro Asp Ser Gly Arg

40

1	5		
(210)4			
(211)7			
(212)PRT			
(213)Homo sapiens			
(400)4			10
Arg Tyr Val Val Leu Pro Arg			
1	5		
(210)5			
(211)6			
(212)PRT			
(213)Homo sapiens			20
(400)5			
Leu Gly Thr Ile Pro Gly			
1	5		
(210)6			
(211)10			
(212)PRT			30
(213)Homo sapiens			
(400)6			
Arg Asn Ile Ala Glu Ile Ile Lys Asp Ile			
1	5	10	
(210)7			
(211)5			40
(212)PRT			



<213>Homo sapiens

<400>7

Ile Lys Val Ala Val

1

5

<210>8

<211>4

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>8

Asp Gly Glu Ala

1

<210>9

<211>15

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>9

Gly Val Lys Gly Asp Lys Gly Asn Pro Gly Trp Pro Gly Ala Pro

1

5

10

15

<210>10

<211>13

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>10

Gly Glu Phe Tyr Phe Asp Leu Arg Leu Lys Gly Asp Lys

1

5

10

10

20

30

40

<210>	11
<211>	8
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	11
Tyr Lys Leu Asn Val Asn Asp Ser	
1                5	10
<210>	12
<211>	6
<212>	PRT
<213>	Bombyx mori
<400>	12
Gly Ala Gly Ala Gly Ser	20
1                5	
<210>	13
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	13
Gly Val Gly Val Pro	30
1                5	
<210>	14
<211>	4
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	14

Arg Gly Asp Ser

1

&lt;210&gt;15

&lt;211&gt;5

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;15

Gly Arg Gly Asp Ser

1

5

&lt;210&gt;16

&lt;211&gt;6

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;16

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1

5

&lt;210&gt;17

&lt;211&gt;10

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Homo sapiens

&lt;400&gt;17

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro

1

5

10

&lt;210&gt;18

&lt;211&gt;12

10

20

30

40

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;18

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala

1

5

10

&lt;210&gt;19

&lt;211&gt;14

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;19

Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser

1

5

10

&lt;210&gt;20

&lt;211&gt;19

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;20

Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser

1

5

10

15

Ala Asp Arg

&lt;210&gt;21

&lt;211&gt;12

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;21

Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp

10

20

30

40

1

5

10

&lt;210&gt;22

&lt;211&gt;16

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;22

10

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

1

5

10

15

&lt;210&gt;23

&lt;211&gt;32

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

20

&lt;400&gt;23

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

1

5

10

15

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

20

25

30

&lt;210&gt;24

&lt;211&gt;64

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

30

&lt;400&gt;24

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

1

5

10

15

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

20

25

30

40

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

35

40

45

Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Ser

50

55

60

<210>25

<211>40

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>25

Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly

1

5

10

15

Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser Gly Arg

20

25

30

Gly Asp Ser Gly Arg Gly Asp Ser

35

40

<210>26

<211>48

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>26

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp

1

5

10

15

Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg

20

25

30

Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro Gly Arg Gly Asp Ser Pro

35

40

45

10

20

30

40

&lt;210&gt;27

&lt;211&gt;40

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;27

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Arg Gly Asp Ser Pro Ala

1

5

10

15

10

Ser Ser Lys Pro Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro Arg Gly

20

25

30

Asp Ser Pro Ala Ser Ser Lys Pro

35

40

&lt;210&gt;28

&lt;211&gt;48

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;28

Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ala Val Thr Gly

1

5

10

15

20

Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser

20

25

30

30

Pro Ala Ser Ala Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala Ser Ala

35

40

45

&lt;210&gt;29

&lt;211&gt;56

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;29

40

Pro Gly Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser  
 20 25 30  
 Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Ile Lys  
 35 40 45  
 Val Ala Val Ser Ala Gly Pro Ser 10  
 50 55

&lt;210&gt;30

&lt;211&gt;76

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;30

Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Asp Arg Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val  
 20 25 30  
 Ala Val Ser Ala Asp Arg Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser  
 35 40 45  
 Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln  
 50 55 60  
 Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser Ala Asp Arg  
 65 70 75

&lt;210&gt;31

&lt;211&gt;48

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence



&lt;400&gt;31

Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Val Cys Glu Pro

1

5

10

15

Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly

20

25

30

Ser Arg Cys Asp Val Cys Glu Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg Cys Asp

35

40

45

10

&lt;210&gt;32

&lt;211&gt;9

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;32

Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly

1

5

20

&lt;210&gt;33

&lt;211&gt;15

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;33

Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln

1

5

10

15

30

&lt;210&gt;34

&lt;211&gt;15

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;34

40

Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro

1

5

10

15

<210>35

<211>54

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>35

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

1

5

10

15

Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala

20

25

30

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser

35

40

45

20

Gly Ala Gly Ala Gly Ser

50

<210>36

<211>40

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<400>36

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

1

5

10

15

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val

20

25

30

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

35

40

40

&lt;210&gt;37

&lt;211&gt;72

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;37

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

1

5

10

15

10

Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala

20

25

30

Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser

35

40

45

Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ala

50

55

60

Gly Ser Gly Ala Gly Ala Gly Ser

20

65

70

&lt;210&gt;38

&lt;211&gt;30

&lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;400&gt;38

30

Gly Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly

1

5

10

15

Ala Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro

20

25

30